HPLC-MS/MS 测定蜂蜜中氨基糖苷类药物残留

杨慧元，杜玥*，徐伟东(上海市食品药品检验所，上海 201203)

摘要：目的 建立测定蜂蜜中大观霉素、潮霉素 B、链霉素、双氢链霉素和阿米卡星等 5 种氨基糖苷类药物残留量的液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)。**方法** 蜂蜜样品中的氨基糖苷类药物经磷酸盐缓冲液提取后，经过弱阳离子固相萃取柱富集净化后，采用液相色谱-三重四极杆串联质谱检测，使用电喷雾离子化源(ESI)，在正离子条件下以多反应监测(MRM)方式进行扫描。采用异帕米星为内标进行定量分析。**结果** 线性范围为 10~1 000 μg·kg^{-1}，各被测物的最低定量浓度为 0.6~5.2 μg·kg^{-1}；以加标样品计算，在各浓度水平下，各被测物的方法回收率为 92.4%~103.2%；提取回收率为 62.5%~81.6%。**结论** 本方法准确、高效，适用于蜂蜜中氨基糖苷类药物残留量的检测。

关键词：氨基糖苷；液相色谱-串联质谱；残留检测；蜂蜜
中图分类号：R917.101 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2011)08-0751-06

Residue Determination of Aminoglycosides in Honey by HPLC-MS/MS

YANG Huiyuan, DU Yue*, XU Weidong(*ShangHai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a specific and sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the residue determination of spectinomycin, hygromycin B, streptomycin, dihydrostreptomycin and amikacin in honey. **METHODS** After extraction of these analytes from honey samples with a phosphate buffer, the extract was loaded on a weak cation-exchange (WCX) solid-phase extraction column. After sample preparation, the hydrophilic interaction chromatography (HILIC) was used to retain the aminoglycosides on the column for the separation of the analytes from endogenous compounds. The aminoglycosides were detected and quantified with triple quadrupole tandem mass spectrometry with ESI source in the positive ion mode. Quantitation was performed using multiple reaction monitoring (MRM) of the transitions with isepamycin as the internal standard. **RESULTS** The linear regressions were fitted over the concentration range of 10–1 000 μg·kg^{-1} for the analytes in honey. The lower limit of quantification of the analytes were all in 0.6–5.2 μg·kg^{-1}. The method and extracted recoveries of the analytes evaluated by determining the spiked samples at all levels were 92.4%–103.2% and 62.5%-81.6%, respectively. **CONCLUSION** The developed LC-MS/MS method is accurate and efficient enough to determine aminoglycosides in honey.
KEY WORDS: aminoglycosides; LC–MS/MS; residue; honey

氨基糖苷类化合物(aminoglycosides)是一种广谱抗生素，对许多革兰氏阴性菌和一些革兰氏阳性菌具有抗菌活性[1-2]。在兽医学和畜牧业领域，氨基糖苷类抗生素被广泛用于治疗细菌性感染，对污仔病(蜜蜂幼虫的疫病，蜜蜂最常见的一类疾病)具有很好的疗效[3-4]。因此，该类药物在养蜂业被广泛应用，这样就可能导致蜂蜜中药物的残留。众所周知，氨基糖苷类抗生素具有耳毒性和肾毒性等不良反应[5]，且这些不良反应多为不可逆的。为保证消费者饮食健康安全，欧盟委员会和美国 FDA 已对诸多动物源性食品，如肉、蛋、奶等基质中的几种氨基糖苷类化合物设定了最大残留限量(MRLs)。尽管欧盟并未对蜂蜜做出限量规定，但英国食品标准署对蜂蜜中链霉素制定了 50 μg·kg^{-1} 的执法限度，瑞士和德国规定蜂蜜中链霉素的 MRLs 为 20 μg·kg^{-1}[6]。蜂蜜作为一种具有保健功效的天然产物，广泛被大众所食用，因此有必要建立一种准确、可靠的分析方法，对蜂蜜中氨基糖苷类残留量进行检测。

氨基糖苷类是由两个或多个氨基糖通过苷键与氨基环醇键合而成的一大类化合物[7]，由于该类化合物结构中缺少发色团和荧光团，需进行柱前

作者简介：杨慧元，男，硕士，主管药师 Tel: (021)50798237 E-mail: yanghy04@yahoo.com.cn *通信作者：杜玥，女，硕士，主管药师 Tel: (021)50798237 E-mail: duyue0170@yahoo.com.cn

或柱后衍生化反应后，采用液相色谱-荧光或紫外检测[8-9]。因为该类化合物具有较强的极性，不易挥发，需进行衍生化后，采用气相色谱法测定[10]。这些衍生化的方法操作较为繁琐，稳定性不高。近年来，液相色谱-串联质谱(HPLC-MS)技术成为测定该类化合物的有力手段。但由于氨基糖苷类化合物具有较强的极性，很难在反相色谱柱上保留，因此，文献多采用在流动相中添加离子对试剂的方式，通过与被测物形成离子对，以增强色谱保留[2-4]。但离子对色谱并不适于电喷雾质谱检测技术，因为离子对试剂对电喷雾质谱信号具有抑制作用，会影响检测的灵敏度。近年来发展起来的亲水作用色谱(HILIC)作为一种分离极性化合物的液相色谱技术，与离子交换技术、离子对色谱等比较起来，具有流动相组成简单，且与质谱兼容等优势，适用于氨基糖苷类化合物的分析[1,6]。本试验首次采用内标法，对蜂蜜中大观霉素、潮霉素 B、链霉素、双氢链霉素和阿米卡星等 5 种氨基糖苷类药物残留量进行检测，经过严格的方法学验证，该法准确、高效，适用于同时测定蜂蜜中 5 种氨基糖苷类药物的残留量。

1 仪器与试药

API 4000 型三重四极杆串联质谱仪(美国应用生物系统公司)，配有电喷雾离子化源(ESI 源)和 Analyst 1.4.1 数据处理系统；Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)；MS 3 basic 旋涡混合器(德国 IKA)；D-37520 台式冷冻离心机(美国 Thermo 公司)。Oasis 混合型弱阳离子(WCX)固相萃取柱(3 cm^3，60 mg，30 μm，美国 Waters 公司)。

大观霉素对照品(批号：072K13827，含量：65.4%)、双氢链霉素对照品(批号：045K0946，含量：98%)均来源于美国 Sigma 公司；潮霉素 B 对照品(批号：80609，含量：98.0%)、链霉素对照品(批号：60522，含量：98%)、阿米卡星对照品(批号：90223，含量：99.0%)均来源于德国 D.E.G 公司；内标：异帕米星(IS，批号：091015，含量：71.1%)；乙腈、甲醇、醋酸、醋酸铵、甲酸均为色谱纯；磷酸氢二钠为分析纯；试验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品储备液的配制　分别精密称取 5 种氨基糖苷类对照品各适量，用水溶解并制成浓度均为 0.1 $mg·mL^{-1}$ 的储备溶液，备用。

2.1.2 混合标准溶液的配制　分别精密吸取上述储备液各适量，置同一量瓶中，用水稀释制成含有上述 5 种氨基糖苷类物质各 5.0 $μg·mL^{-1}$ 的混合标准溶液。

2.1.3 内标工作液　准确称取异帕米星对照品适量，用水稀释制成含 50 $μg·mL^{-1}$ 的溶液，作为内标工作液。

2.2 样品预处理

准确称取混匀的蜂蜜样品 5.00 g，置于 50 mL 聚丙烯塑料管中，加入内标工作液 50 μL，加入 20 $mmol·L^{-1}$ Na_2HPO_4 缓冲溶液(用 6 $mol·L^{-1}$ 的盐酸溶液调节 pH 至 7.4)15 mL，旋涡振荡 30 s，于 4 600 $r·min^{-1}$ 离心 5 min，上清液转移至另一个 50 mL 离心管中备用。

取 WCX 固相萃取小柱，依次用甲醇 5 mL、水 5 mL 活化小柱，将上述备用溶液以一定速度上样至固相萃取柱。用水 5 mL 洗涤柱子，在负压下干燥 30 s，用洗脱溶液(2% 醋酸溶液-乙腈，80∶20) 2 mL 洗脱色谱柱，收集洗脱液，吸取 10 μL 进样检测。

2.3 LC-MS/MS 条件

2.3.1 色谱条件　色谱柱：Atlantis ™ HILIC Silica 柱(2.1 mm×50 mm，3 μm)；流动相：A 为乙腈-20 $mmol·L^{-1}$ 醋酸铵-甲酸(5∶95∶0.2)，B 为乙腈-20 $mmol·L^{-1}$ 醋酸铵-甲酸(95∶5∶0.2)，梯度洗脱程序：0~0.6 min 100% B，1.6~7.0 min 10% B，7.5~11 min 100% B；流速：0.3 $mL·min^{-1}$；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.3.2 质谱条件　离子源为 ESI 源；正离子模式检测；扫描方式为多反应监测(MRM)；雾化气流速：413.7 kPa；加热气流速：413.7 kPa；气帘气流速：82.74 kPa；碰撞气流速：34.475 kPa；电喷雾电压：5 kV；离子源温度：500 ℃。用于定量、定性分析的离子对和相关质谱参数见表 1。

表 1 被测物及内标的质谱参数

Tab 1 Mass spectrometry parameters for the analytes and IS

化合物	定量通道	碰撞能量/eV	定性通道	碰撞能量/eV
大观霉素	333.1/140.1	35	333.1/189.1	32
潮霉素 B	528.3/177.3	45	528.3/352.1	34
链霉素	582.3/263.1	47	582.3/407.3	41
双氢链霉素	584.2/263.2	45	584.2/409.3	42
阿米卡星	586.3/425.3	29	586.3/324.2	32
IS(异帕米星)	570.3/411.3	26	570.3/250.1	40

2.4 结果

2.4.1 质谱分析 采用电喷雾离子化源(ESI)，以正离子方式进行检测。以一级全扫描质谱图中所得到的各氨基糖苷类物质的准分子离子($[M+H]^+$)作为各自的母离子，选择性对其进行碰撞诱导解离，以峰度较强的二级碎片离子作为各自的定量离子，采用 MRM 扫描方式，以上述离子反应进行定量分析，具有较高的专属性。各氨基糖苷类物质和内标(异帕米星)的二级全扫描质谱图见图 1。

2.4.2 专属性试验 取空白蜂蜜，按“2.2”项下方法操作，不添加内标，色谱图见图 2；同时在空白蜂蜜中添加混合标准溶液，使各被测物浓度为 10 μg·kg^{-1}，加入内标工作液 50 μL，按“2.2”项下方法操作，蜂蜜加标色谱图见图 3。试验结果表明，蜂蜜中内源性物质不干扰氨基糖苷类待测物和内标的测定。

2.4.3 标准曲线和线性范围 准确称取空白蜂蜜样品各 5.00 g，分别置于 50 mL 聚丙烯塑料管中，分别加入混合标准溶液(5.0 μg·mL^{-1})10，20，100，200，500 和 1 000 μL，制成相当于浓度 10，20，100，200，500 和 1 000 μg·kg^{-1} 的蜂蜜样品，加入

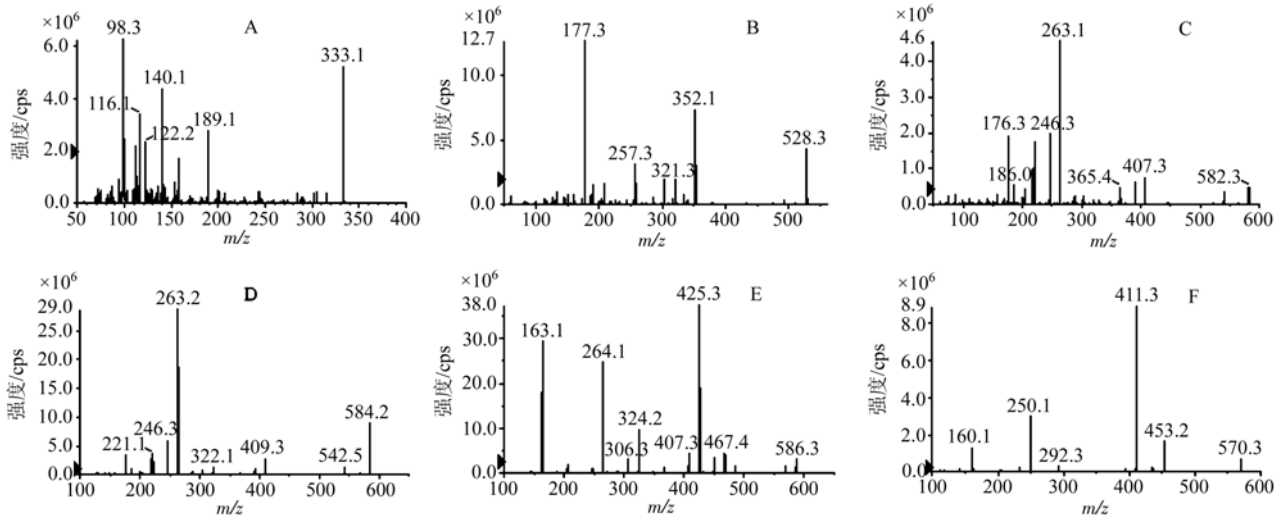

图 1 氨基糖苷类物质和内标二级全扫描质谱图

A–大观霉素；B–潮霉素；C–链霉素；D–双氢链霉素；E–阿米卡星；F–异帕米星(内标)

Fig 1 Full scan MS^2 spectra of analytes and IS

A–spectinomycin; B–hygromycin; C–streptomycin; D–dihydrostreptomycin; E–amikacin; F–IS

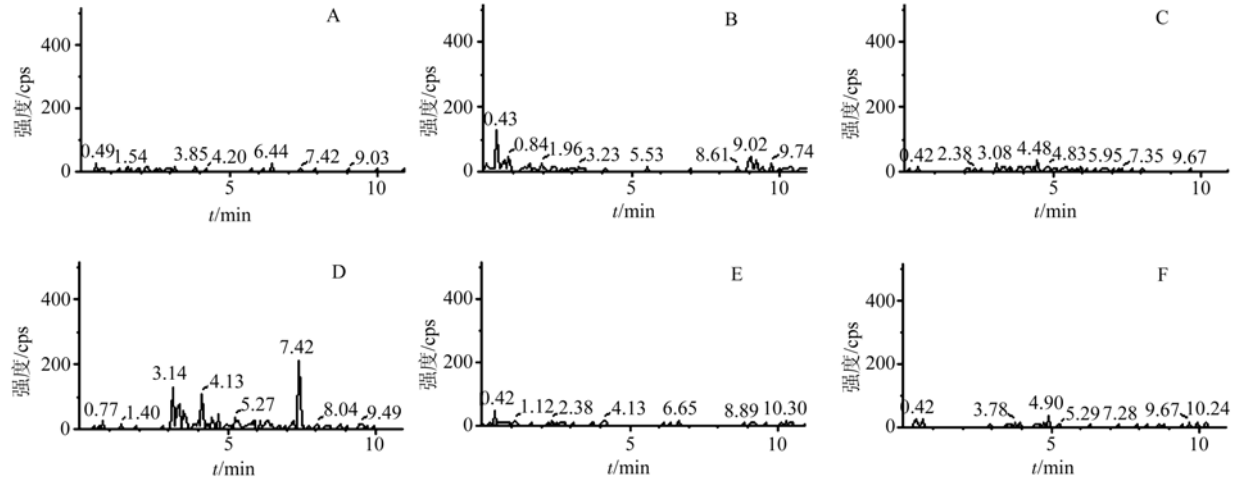

图 2 空白蜂蜜中氨基糖苷类物质和内标的色谱图

A–大观霉素；B–潮霉素；C–链霉素；D–双氢链霉素；E–阿米卡星；F–异帕米星(内标)

Fig 2 Typical chromatograms of analytes and IS in blank honey

A–spectinomycin; B–hygromycin; C–streptomycin; D–dihydrostreptomycin; E–amikacin; F–IS

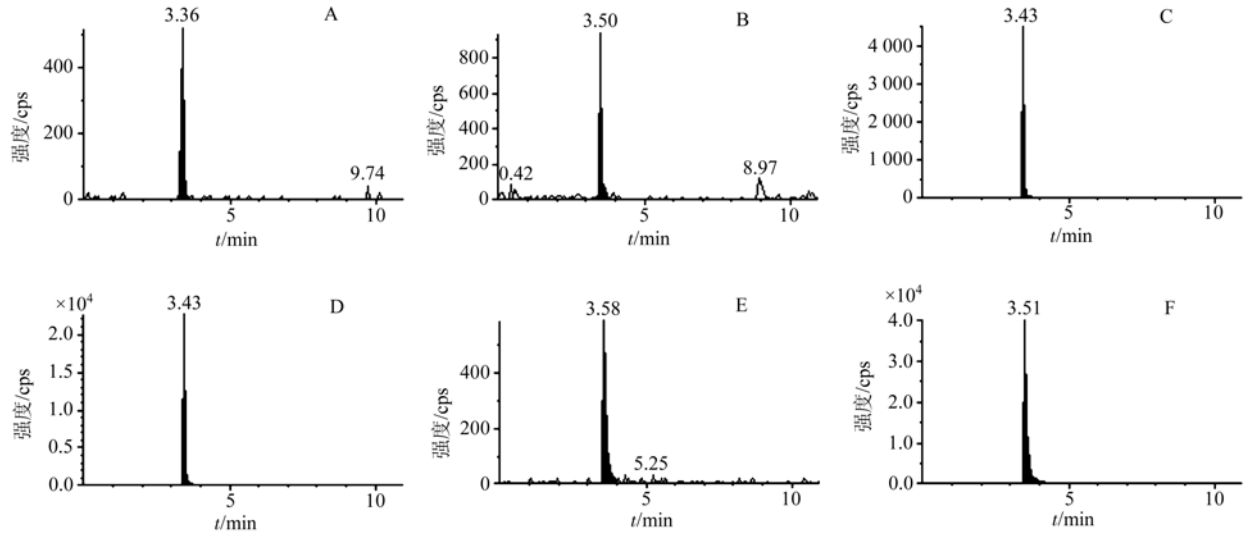

图 3 空白蜂蜜中添加 10 μg·kg^{-1} 的被测物后的色谱图

A–大观霉素；B–潮霉素；C–链霉素；D–双氢链霉素；E–阿米卡星；F–异帕米星(内标)

Fig 3 Typical chromatograms of analytes and IS in honey spiked with 10 μg·kg^{-1} levels

A–spectinomycin; B–hygromycin; C–streptomycin; D–dihydrostreptomycin; E–amikacin; F–IS

内标工作液 50 μL，按“2.2”项下方法进行预处理后进样测定。分别以各被测物与内标的峰面积之比为纵坐标，以被测物浓度(μg·kg^{-1})为横坐标，进行线性回归，在 10~1 000 μg·kg^{-1} 内线性良好，各被测物的典型线性回归方程及相关系数见表 2。

表 2 被测物的线性回归方程和相关系数

Tab 2 Linear regression equations and correlation coefficients of the analytes

化合物	线性范围/μg·mL^{-1}	线性回归方程	r
大观霉素	10~1 000	Y=1.661×10^{-3}X−2.624×10^{-2}	0.999 1
潮霉素 B	10~1 000	Y=1.023×10^{-3}X+1.657×10^{-2}	0.998 5
链霉素	10~1 000	Y=4.572×10^{-3}X+2.871×10^{-1}	0.996 8
双氢链霉素	10~1 000	Y=2.041×10^{-2}X+7.424×10^{-1}	0.999 6
阿米卡星	10~1 000	Y=6.483×10^{-4}X+1.561×10^{-2}	0.996 4

2.4.4 精密度试验　精密称取空白蜂蜜 5.00 g，置于 50 mL 聚丙烯塑料管中，分别准确添加 5.0 μg·mL^{-1} 混合标准溶液 10，100 和 1 000 μL，制成含各被测物 10，100 和 1 000 μg·kg^{-1} 的加标样本，按“2.2”项下方操作。每个浓度水平进行 5 个样本分析，连续测定 3 d，随行标准曲线，计算日内和日间精密度。结果见表 3。

2.4.5 回收率试验　按“2.4.4”项下方法制备低、中、高浓度的蜂蜜样品，各 5 份，进行测定，以实测浓度与理论添加浓度之比计算各被测物的方法回收率；同时配置相同浓度的混合标准溶液，以经过提取的蜂蜜样品中各被测物峰面积与相应浓度标准溶液中该被测物峰面积之比，计算各被测物的提取回收率，结果见表 4。

表 3 被测物的日内和日间精密度

Tab 3 Intra-day and inter-day precision of the analytes

化合物	日内精密度 RSD/% (n=5)			日间精密度 RSD/% (n=15)		
	10 μg·kg^{-1}	100 μg·kg^{-1}	1 000 μg·kg^{-1}	1.0 μg·kg^{-1}	100 μg·kg^{-1}	1 000 μg·g^{-1}
大观霉素	7.1	6.4	4.3	8.3	6.9	4.7
潮霉素 B	6.3	6.1	4.0	7.2	6.8	4.2
链霉素	5.5	4.4	4.0	7.1	5.2	4.6
双氢链霉素	4.2	3.7	3.3	4.6	4.1	3.8
阿米卡星	10.3	8.5	5.4	10.8	9.6	6.7

表 4 被测物的方法回收率和提取回收率(n=5)

Tab 4 Method and extracted recoveries of the analytes(n=5)

化合物	方法回收率						提取回收率					
	10 μg·kg^{-1}		100 μg·kg^{-1}		1 000 μg·kg^{-1}		10 μg·kg^{-1}		100 μg·kg^{-1}		1 000 μg·kg^{-1}	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
大观霉素	98.6	7.1	94.1	6.4	96.5	4.3	81.6	12.6	79.3	9.1	80.2	8.9
潮霉素 B	102.1	6.3	99.7	6.1	99.2	4.0	71.4	9.7	70.6	10.5	76.5	9.2
链霉素	94.9	5.5	102.1	4.4	98.7	4.0	69.5	8.7	70.3	7.3	65.7	6.3
双氢链霉素	99.3	4.2	98.5	3.7	99.8	3.3	80.3	7.9	77.4	8.5	76.7	8.8
阿米卡星	103.2	10.3	92.4	8.5	98.6	5.4	67.5	13.2	62.5	11.6	68.4	9.9

2.4.6 最低定量浓度(LOQ)与最低检测浓度(LOD) 以信噪比 10∶1 和 3∶1 分别计算各被测物的 LOQ 和 LOD，结果见表 5。

表 5 被测物的 LOQ(n=5)与 LOD

Tab 5 LOQ(n=5) and LOD of the analytes

化合物	LOQ/μg·kg^{-1}	LOD/μg·kg^{-1}
大观霉素	5.2	1.8
潮霉素 B	4.4	1.5
链霉素	1.0	0.4
双氢链霉素	0.6	0.2
阿米卡星	5.0	1.7

3 讨论

3.1 有机相的比例

HILIC 技术使用的是反相色谱系统的流动相，但其色谱行为与反相色谱是相反的，即普通的反相色谱是随着甲醇或乙腈等有机相的比例增加而保留时间减少，但是 HILIC 则相反，有机相比例增加，保留时间延长。试验中对乙腈比例进行了考察。在流动相梯度程序的起始阶段使用高比例乙腈，以增加待测物在色谱柱上的保留，从而与基质中内源性杂质得以分离，随后逐渐提高水相比例，使各被测物保留时间较为合理，并且利于改善色谱峰峰形。

3.2 缓冲盐的浓度

试验中对缓冲盐的浓度进行了考察，分别考察了 2，5，10，20，50 和 100 mmol·L^{-1}醋酸铵条件下各待测物的响应。结果表明，醋酸铵浓度< 5 mmol·L^{-1}时，待测物较难被洗脱，色谱峰多展宽；当缓冲盐浓度>50 mmol·L^{-1}时，色谱峰响应降低，经分析，可能因为缓冲盐浓度过高时会产生一定程度的离子抑制。通过对洗脱能力和灵敏度方面的权衡，确定醋酸铵浓度为 20 mmol·L^{-1}，试验结果重现性较好。

3.3 固相萃取柱的选择

氨基糖苷类化合物多呈碱性，尤其是链霉素，碱性较强。为提高试验的选择性和专属性，样品前处理环节采用离子交换柱进行固相萃取，分别对 WCX 固相萃取柱和混合型强阳离子(MCX)交换柱进行了考察。结果表明，采用 MCX 交换柱，链霉素和双氢链霉素回收率很低，经分析，强碱性化合物与 MCX 交换柱结合牢固，几乎无法被洗脱，故选用 WCX 柱进行富集净化，试验具有较好的回收率和选择性。

3.4 内标物的选择

为提高分析结果的准确性，试验采用内标法，但因该类化合物的氘代内标价格高昂，不易获得，试验中对该类化合物中安普霉素、妥布霉素、新霉素、异帕米星等几种化合物分别进行考察，结果表明，异帕米星在色谱行为、回收率等方面与待测物最为一致，有效提高了方法的准确性和稳定性。故选择异帕米星作为内标。

3.5 质谱分离

本法中链霉素和双氢链霉素保留时间几乎相同，其他几个被测物的保留时间亦较为接近，但鉴于质谱检测器具有强大的质量分辨功能，对于质荷比不同的化合物，无需达到色谱分离，也可通过不同的质量通道进行质谱分离，从而实现专属的测定。

REFERENCES

[1] OERTEL R, RENNER U, KIRCH W. Determination of neomycin by LC-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 35(3): 633-638.

[2] CHERLET M, DE BAERE S, DE BACKER P. Quantitative determination of dihydrostreptomycin in bovine tissues and milk by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem

mass spectrometry [J]. J Mass Spectrom, 2007, 42(5): 647-656.

[3] VAN BRUIJNSVOORT M, OTTINK S J, JONKER K M, et al. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2004, 1058(1/2): 137-142.

[4] KAUFMANN A, BUTCHER P, KOLBENER P. Trace level quantification of streptomycin in honey with liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003, 17(22): 2575-2577.

[5] BOGIALLI S, CURINI R, DI CORCIA A, et al. Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2005, 1067(1/2): 93-100.

[6] HANCOCK P. A confirmatory LC/MS/MS method for the determination of streptomycin in honey [Z]. Waters application note, No. 720000981EN.

[7] STEAD D A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides [J]. J Chromatogr B, 2000, 747(1/2): 69-93.

[8] EDDER P, COMINOLI A, CORVI C. Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection [J]. J Chromatogr A, 1999, 830(2): 345-351.

[9] KAALE E, LEONARD S, VAN SCHEPDAEL A, et al. Capillary electrophoresis analysis of gentamicin sulphate with UV detection after pre-capillary derivatization with 1,2-phthalic dicarboxaldehyde and mercaptoacetic acid [J]. J Chromatogr A, 2000, 895(1/2): 67-79.

[10] PREU M, GUYOT D, PETZ M. Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions [J]. J Chromatogr A, 1998, 818(1): 95-108.

收稿日期：2010-12-29